

Title	近位尿細管刷子縁膜小胞におけるL-glutamate輸送系の解明
Author(s)	中西, 健
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35011
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照 ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・（本籍）	なか 中	にし 西	たけし 健
学位の種類	医	学	博士
学位記番号	第	6954	号
学位授与の日付	昭和60年7月4日		
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当		
学位論文題目	近位尿細管刷子縁膜小胞におけるL-glutamate輸送系の解明		
論文審査委員	(主査) 教授	鎌田	武信
	(副査) 教授	中馬	一郎 教授 田川 邦夫

論文内容の要旨

(目的)

近位尿細管では体液調節の第一段階としてD-glucose, アミノ酸等がNa⁺との共輸送により再吸収されている。これらの溶質の中でも近位尿細管細胞内濃度が高値を示すことが知られ、その高濃度維持の機構が輸送系と密接に関連していると考えられる酸性アミノ酸輸送系は、臨床的にもその輸送障害が酸性アミノ酸尿として知られている。本研究では酸性アミノ酸再吸収機構を解明するため、L-glutamate輸送系のnephron heterogeneity, L-glutamateと陽イオンのcoupling stoichiometry, 電位形成性を、家兎腎皮質外層(OC)および髄質外層(OM)より調製した尿細管刷子縁膜小胞(BBMV)を用い検討した。

(方法)

(1) 腎刷子縁膜小胞の調製 体重約2kgの雄性家兎を断頭開腹し、腎を灌流・脱血後摘出した。tissue slicerおよび実体顕微鏡を用いOC, OMを切り取った。各々の組織をhomogenate後、Ca²⁺沈殿法によりBBMVを調製した。特記しない限りBBMVは10mM Tris-Hepes (pH 7.4), 100 mM Mannitol (以下Buffer Aと略す) および60mM KClを含む溶液中に懸濁した。(2) 迅速濾過法 uptake測定は迅速濾過法によった。BBMV 20 μ lを入れた試験管をmixerにて攪拌しつつ、ここにL-[³H]-glutamateと反応に必要な溶質を含むincubation溶液 100 μ lを加え反応を開始させた。但し、各実験に用いた溶液組成に関しては成績に詳述した。適当時間のincubation後水冷反応停止液(300 mM NaCl, 0.2 mM HgCl₂を含むBuffer A)を加えた後、filter上で吸引・濾過し、液体シンチレーションカウンターにより放射活性を測定した。

(成 績)

(1) BBMVの酵素学的検討 OC, OM由来のhomogenateにおいて各酵素活性に有意な差を認めず, 刷子縁膜の標識酵素maltase, alkaline phosphataseの比活性はOC, OMともhomogenateの8.5倍以上上昇し他の細胞内成分の混入はわずかで良好な膜標品であった。(2) BBMV外Na⁺およびBBMV内K⁺の影響 BBMVはBuffer A+60 mM KClまたはBuffer A+mannitolでpreloadした。反応液としてBuffer A+60mM NaClまたはBufferA+60mM choline Clを用いた。内向きNa⁺ 勾配, 外向きK⁺ 勾配条件にのみ著明なconcentrative uptakeがみられL-glutamate 輸送には, Na⁺, K⁺の何れも不可欠である事が示唆された。(3) Kinetics 全皮質(WC)より調製したBBMVで, 10秒間のL-glutamate uptake (flux)を初速度とし, L-glutamate濃度の関数として測定した。これらのdataをEadie-Hofstee plotすると, curvilinearな回帰が得られた。このことは, WC-BBMVには2つ以上のL-glutamate輸送系が存在することを示唆する。そこで, OC, OM-BBMVで同様の検討を行なうと, これらのplotは異なる直線回帰を示し, Michaelis-Menten式を満たすことから, それぞれに異なる単一の輸送系が存在することが示唆された。すなわちOC-BBMVにおけるみかけのkinetic parametersは $K_m = 46.1 \pm 7.0 \mu\text{M}$, $V_{\text{max}} = 1.13 \pm 0.28 \text{ nmoles/min/mg protein}$ であるのに対しOM-BBMVでは $K_m = 28.8 \pm 4.5 \mu\text{M}$, $V_{\text{max}} = 2.78 \pm 0.49 \text{ nmoles/min/mg protein}$ と有意にhigh affinity, high capacityであった。(4) L-glutamate 輸送系のアミノ酸に対する特異性 L-glutamate fluxの他のアミノ酸による抑制を検討した。D-glutamateでは抑制がみられなかったが酸性アミノ酸であるL-aspartate, D-aspartateの場合には各々約80%, 約60%と, 強いuptake抑制がみられ, 両者はL-glutamateと共通の系を介して輸送されていることが示唆された。(5) 外向きK⁺勾配依存性 BBMV内K⁺濃度の関数としてfluxを測定した。OC, OM-BBMVのいずれにおいても, K⁺濃度上昇に伴いhyperbolicなflux増加がみられた。これらをEadie-Hofstee plotすると, いずれの成分も直線回帰を呈しMichaelis-Menten型kineticsに従うことが示されL-glutamateとK⁺が1:1の関係で輸送されていることが示唆された。(6) 内向きNa⁺勾配依存性 BBMV外Na⁺濃度の関数としてfluxを測定した。fluxはNa⁺濃度に対しsigmoid状に増加した。これはL-glutamate輸送に複数個のNa⁺が関与することを示唆している。そこで, これらのdataをHill式にあてはめ, L-glutamateに関与するNa⁺数(n)を算出した。OC-BBMVでは $n = 1.96$, OM-BBMVでは $n = 1.93$ でnがほぼ等しいことより, いずれのL-glutamate輸送系にも少なくとも2ケのNa⁺が関与することが示唆された。(7) BBMV外陰イオンの影響 BBMVをBuffer A+60 mM K-gluconateでpreloadし, 反応液として60 mM Na⁺を与えるCl⁻, SCN⁻, SO₄²⁻あるいはgluconate⁻塩を含むBuffer Aを用いた。fluxは $\text{NaSCN} > \text{NaCl} > \text{Na}_2\text{SO}_4 = \text{Na-gluconate}$ の順に大でBBMV外陰イオンのchaotropic actionの強い順, すなわち膜透過性の高い順に大きかった。(8) BBMV内陰イオンの影響 BBMVを60mM K⁺を与えるCl⁻, SCN⁻, SO₄²⁻あるいはgluconate⁻塩を含むBuffer Aでpreloadし, 反応液としてNa-gluconateを含むBuffer Aを用いた。fluxは $\text{KSCN} < \text{KCl} < \text{K}_2\text{SO}_4 = \text{K-gluconate}$ の順に小さく, BBMV外陰イオンの成績と逆であった。すなわち, BBMV内陰イオンの膜透過性が大であるほどuptakeは抑制されることが示された。7), 8)の成績よりL-glutamate輸送系が電位形成性であることを確認した。

(総括)

- (1) OM-BBMVのL-glutamate輸送系はOC-BBMVに比し有意にhigh affinity, high capacityであった。
- (2) OCおよびOM-BBMVでのL-glutamate輸送系が電位形成性であることを確認した。
- (3) L-glutamate輸送系のL-glutamate/ K^+ coupling ratioは1 : 1であった。
- (4) Hill式より求めたL-glutamate輸送系のL-glutamate/ Na^+ coupling ratioは1 : 2であったが、測定条件のpH7.4ではL-glutamateがnetとして-1価に荷電し、輸送が電位形成性であることを考慮すると1 : 3以上の可能性が示唆された。

論文の審査結果の要旨

本研究は近位尿細管刷子縁膜小胞を調製し、膜レベルにおいてL-glutamate輸送系を解明したものである。すなわち、L-glutamate輸送系の近位尿細管におけるheterogeneity, L-glutamateと Na^+ 及び K^+ のcoupling stoichiometry, L-glutamate輸送系が電位形成性であることを初めて明らかとした。本研究は尿細管膜輸送に新知見を加えるのみならず、輸送異常疾患の膜レベルにおける解析に対して極めて意義のある研究である。